

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MERKAČ
DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MERKAČ

**PRIMERJAVA KOMERCIALNO DOSTOPNEGA IN IZOLIRANEGA
ETERIČNEGA OLJA CVETOV DIŠEČEGA KLINČEVCA (*SYZYGIIUM
AROMATICUM*), IZOLACIJA EVGENOLA IN SINTEZA**

COMPARISON OF COMERCIALLY AVAILABLE AND ISOLATED
ESSENTIAL OIL OF CLOVE BUDS (*SYZYGIIUM AROMATICUM*),
ISOLATION OF EUGENOL AND SYNTHESIS

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo in Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm.

Zahvala

Za pomoč v vseh oblikah se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. in somentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. Zahvalila bi se staršem, ki sta mi omogočila študij in me vzpodbujala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm. in somentorja prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm.

Maja Merkač

Ljubljana, 2016

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO TABEL	III
KAZALO SLIK.....	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD.....	1
1.1 Rastlinski material oziroma rastlinska droga.....	1
1.1.1 Ekstrakcija rastlinskega materiala.....	1
1.2 Eterična olja	3
1.2.1 Kozmetično aktivne snovi (KAS), izolirane iz eteričnih olj.....	3
1.3 Dišeči klinčevcevec	4
1.4 Evgenol.....	5
1.4.1 Uporaba evgenola.....	6
2 NAMEN DELA	7
3 MATERIALI IN METODE.....	8
3.1 Materiali.....	8
3.1.1 Reagenti in topila	8
3.1.2 Programska oprema.....	8
3.1.3 Aparature	8
3.1.4 Rastlinski material.....	8
3.2 Metode.....	8
3.2.1 Izolacija eteričnega olja – destilacija z vodno paro	8
3.2.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)	8
3.2.3 Kolonska kromatografija	9
3.2.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	9
3.2.5 Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS).....	9

3.2.6	Masna spektrometrija	9
4	EKSPERIMENTALNI DEL	10
4.1	Izolacija eteričnega olja cvetov dišečega klinčevca	10
4.1.1	Frakcionirna vakuumaska destilacija	10
4.1.2	TLC – analiza frakcij eteričnega olja dišečega klinčevca	12
4.1.3	Kolonska kromatografija	14
4.1.4	Alkalna ekstrakcija	15
4.2	Sinteza derivatov evgenola	16
4.2.1	Reakcija acetiliranja	16
4.3	GC-MS.....	16
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	18
5.1	Komentar k izolaciji eteričnega olja.....	18
5.2	Komentar h GC-MS	18
5.2.1	Primerjava eteričnih olj	19
5.3	Komentar k frakcionirni vakuumski destilaciji.....	20
5.4	Komentar h kolonski kromatografiji	23
5.5	Komentar k alkalni ekstrakciji	23
5.6	Komentar k reakciji acetiliranja	24
6	SKLEP	26
7	LITERATURA.....	27
7.1	VIRI SLIKOVNEGA GRADIVA	28
8	PRILOGE.....	29

KAZALO TABEL

Tabela I: Frakcije EO FFA.	11
Tabela II: Frakcije EO CAELO.	11
Tabela III: EO FFA.	18
Tabela IV: EO CAELO.	18
Tabela V: Frakcija 1 EO FFA.	20
Tabela VI: Frakcija 2 EO FFA.	20
Tabela VII: Frakcija 3 EO FFA.	21
Tabela VIII: Frakcija 1 EO CAELO.	21
Tabela IX: Frakcija 2 EO CAELO.	22
Tabela X: Frakcija 3 EO CAELO.	22
Tabela XI: Kolona frakcija 1 EO FFA.	23
Tabela XII: Alkalna ekstrakcija frakcija 2 EO FFA.	24
Tabela XIII: Reakcija acetiliranja.	24

KAZALO SLIK

Slika 1: Rastlinski material.	1
Slika 2: Eterično olje.	3
Slika 3: Klinčki oziroma dišeči klinčevец.	5
Slika 4: Levo-destilacija z vodno paro, desno-lij ločnik.(Foto: M. Merkač).....	10
Slika 5: Aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo. (Foto: M. Merkač)	11
Slika 6: Videz frakcij. (Foto: M. Merkač)	12
Slika 7: TLC primerne mobilne faze v razmerju 19:1. (Foto: M. Merkač)	14
Slika 8: Kolona. (Foto: M. Merkač)	15

POVZETEK

Dišeči klinčevcevec se uporablja v prehrambni, kozmetični in parfumski industriji ter zobozdravstvu. Zaradi tako širokega spektra delovanja in učinkovitosti je nepogrešljiv v vsakdanjem življenju.

Iz cvetov dišečega klinčevca pridobivamo eterično olje, ki je bogato z evgenolom. Ta ima močan, specifičen vonj in okus ter antiseptično, lokalno anestetično in antioksidativno delovanje.

Iz cvetov dišečega klinčevca smo izolirali eterično olje s postopkom vodno parne destilacije in ga po sestavi primerjali s komercialno dostopnim. S frakcionirno vakuumsko destilacijo smo ga ločili na več frakcij z različnimi intervali vrelišča. Iz izbrane frakcije smo nato s kolonsko kromatografijo pridobili več kot 98-odstotno čist evgenol. Skoraj 100-odstotno čist evgenol smo pripravili s kombinacijo vakuumске destilacije in ekstrakcije v bazični vodni medij. Z acetanhidridom smo evgenol pretvorili v evgenilacetat, druge reakcije alkiliranja in aciliranja pa so bile neuspešne. Identiteto produkta smo dokazali s spektroskopskimi metodami.

ABSTRACT

Clove is used in food, cosmetic, perfume and dental industry. Given such a wide range and specter in efficiency, it is indispensable in everyday life.

Essential oil is obtained from the leafs of the clove, which are rich with eugenol. It has a strong specific taste and smell, with antiseptic, local anesthetic and antioxidant activity.

Essential oil was isolated from the leafs of the fragrant flower, with the steam distillation process, and compared with the composition of the commercially available product. With fractional vacuum distillation we separated it into several fractions, with different boiling point intervals. From a selected fraction we later obtained, with column chromatography, over 98 percent pure eugenol. Nearly 100 percent pure eugenol was prepared by a combination of vacuum distillation and extraction with the alkaline aqueous solution. With the acetic anhydride we converted eugenol into eugenyl acetate, while other alkylation and acylation reactions were unsuccessful. The identity of the product was proven by spectroscopic methods.

SEZNAM OKRAJŠAV

EO – eterično olje

EO CAELO – komercialno dostopno eterično olje podjetja CAELO

EO FFA – izolirano eterično olje na Fakulteti za farmacijo

GC – plinska kromatografija

GC-MS – plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

KAS – kozmetično aktivna sestavina

MF – mobilna faza

MS – masna spektrometrija

NMR – magnetna jedrska resonanca

SF – stacionarna faza

TLC – tankoplastna kromatografija

1 UVOD

Potrošniki se pri nakupu kozmetičnih izdelkov vedno bolj nagibajo k uporabi naravnih, predvsem rastlinskih sestavin, saj v večini primerov predstavljajo bolj varen in zdrav način negovanja kože. To je zlasti upravičeno pri nakupu in uporabi eteričnih olj, saj je delovanje posameznih sestavin v njih sinergistično in se ne more primerjati s sintezno pridobljenimi snovmi. Sinergija v eteričnih oljih pomeni, da je skupen učinek v eteričnem olju boljši, kakor učinek vsake sestavine posebej (1).

1.1 Rastlinski material oziroma rastlinska droga

Rastlinske snovi so lahko cele, razdrobljene ali razrezane rastline, deli rastlin, alge, glive, lišaji v neobdelanem stanju, navadno so posušene, včasih tudi sveže (slika 1). Rastlinske snovi so tudi nekateri rastlinski izločki, ki niso posebej obdelani. Izraz rastlinske snovi ustreza izrazu rastlinske droge v Evropski farmakopeji (2). Sestavine rastlinskih drog so zdravilne učinkovine, zelene balastne snovi ter neželene balastne snovi. Na podlagi tega, katere učinkovine/sestavine želimo izolirati, se odločimo za ustrezno metodo ekstrakcije rastlinskega materiala oziroma droge (3).



Slika 1: Rastlinski material.

Pripravki rastlinskega izvora so pridobljeni z obdelavo rastlinskih snovi z različnimi postopki, npr. ekstrakcijo, destilacijo, s stiskanjem, frakcioniranjem, prečiščevanjem, koncentriranjem ali fermentacijo (2).

1.1.1 Ekstrakcija rastlinskega materiala

Izвлеčki ali ekstrakti so tekoči, poltrdni in trdni pripravki iz rastlinskih drog ali živalskih materialov (4). Rastlinski material oziroma drogo ekstrahiramo na različne načine. Poznamo ekstrakcijo s topili, destilacijo z vodno paro, ekstrakcijo s superkritičnimi fluidi ter enfleražo (3).

Ekstrakcijo z organskimi topili uporabljamo pri rastlinskih snoveh, ki so termolabilne in pri destilaciji z vodno paro ne dajo eteričnega olja. Dobimo konkret, iz katerega z etanolno ekstrakcijo in uparevanjem topila pripravimo absolut. Problem predstavljajo zaostala topila (5).

Ekstrakcija s superkritičnimi fluidi je sodobna metoda, primerna za vse rastlinske snovi. Izvedemo jo s superkritičnimi fluidi (CO_2), pri kateri dobimo superkritični izvleček, ki je visoke kakovosti, saj ne vsebuje zaostalih topil, zaradi nizke temperature ekstrakcije je metoda primerna za termolabilne snovi (6,7).

Enfleraža je tradicionalna metoda, ki jo zaradi visoke cene redko uporabljamo. Delo poteka ročno in je primerno za občutljive cvetove, ki ne prenesejo destilacije. Cvetove položimo na ploščo, premazano s prečiščeno maščobo, in pustimo 24 ur. Postopek ponovimo 36-krat, dobljen produkt se imenuje pomada (cvetovi z maščobo), iz katere z etanolno ekstrakcijo naredimo absolut (5).

Najbolj uporabljana metoda je destilacija z vodno paro, saj je preprosta in poceni, vendar je primerna za toplotno neobčutljive snovi. Njen produkt je eterično olje ter aromatična voda (hidrolat), ki se ne mešata (6).

1.2 Eterična olja

Eterična olja so lipofilne tekočine, kompleksne zmesi hlapnih organskih snovi, zelo težko topna v vodi, ki jih pridobivamo po enem od prej opisanih postopkov (slika 2). Navadno imajo manjšo gostoto od vode, izrazit vonj in okus. Uporabljamo jih za odisavljanje kozmetičnih izdelkov, so sestavina parfumov, imajo protimikrobno delovanje, pogosto so občutljiva na kisik, svetlobo ali toploto, kar pomeni, da jih moramo ustrezno shranjevati. Poznamo terpenoidni tip eteričnih olj, ki vsebujejo terpene in terpenoide (na primer limonen in linalool) ter fenilpropanoidni tip eteričnih olj, ki vsebujejo fenilpropanoide (na primer anetol, evgenol, safrol, miristicin) (5).



Slika 2: Eterično olje.

1.2.1 Kozmetično aktivne snovi (KAS), izolirane iz eteričnih olj

KAS izoliramo iz zmesi na osnovi razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih, npr. topnosti (kristalizacija, obarjanje), na osnovi različnega porazdeljevalnega koeficienta (porazdelitev med nemešajoči se topili) ter na podlagi dialize, reverzne osmoze, ultrafiltracije. Poznamo tudi kromatografske tehnike – kolonska kromatografija, tankoplastna kromatografija (TLC), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) in plinska kromatografija (GC) (8).

KAS identificiramo oziroma karakteriziramo z barvnimi reakcijami, obarjalnimi reakcijami, kromatografskimi metodami (TLC, HPLC, GC), spektroskopskimi in spektrometrijskimi metodami (UV, IR, NMR, MS, DSC, rentgenska kristalografija) ter sklopljenimi metodami (LC-MS, LC-NMR, GC-MS) (8).

KAS lahko vrednotimo tudi biološko, kar pomeni, da proučujemo vezavo in neposreden vpliv na biomolekule. Vrednotenje lahko poteka tudi z uporabo živalskih modelov (8).

1.3 Dišeči klinčevce

Klinčki oziroma nageljnovе žbice so posušeni cvetni popki, ki jih pridobivamo iz do 20 m visokega zimzelenega drevesa *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et L. M. Perry. Drevo ima usnjate, okrog 15 cm dolge liste in močno dišeče cvetove. Sodi v družino mirtovk (Myrtaceae) (slika 3). Cvetovi se začnejo razvijati 4 leta po tem, ko ga posadimo. Na enem hektarju zemlje lahko proizvedemo približno 300 kg nageljnove žbice (9, 10).

Nageljnovе žbice sodijo med najdragocenejše začimbe, ki se že stoletja uporabljajo kot konzervansi in v razne terapevtske namene. Izvirajo iz Indonezije, danes pa jih pridobivajo na različnih koncih sveta. Celotne cvetne popke dišečega klinčevca sušijo, dokler niso rdečerrjave barve. Posušeni cvetni popki vsebujejo 15 do 20 % eteričnega olja, čigar glavne sestavine so evgenol (60-95 %), evgenilacetat (2-15 %) in β -kariofilen (5-10 %). Je najbogatejši vir fenolnih sestavin, na primer evgenola, ki se uporablja v farmacevtske, kozmetične, prehranske in kmetijske namene. Z mnogimi študijami je dokazano, da deluje protimikrobno, lokalno anestetično in antioksidativno. (11, 12, 13).

Protimikrobno delovanje so dokazali s študijo na patogenih izoliranih iz banane. Prav tako so protimikrobno delovanje dokazali s študijo na 25 različnih vrstah bakterij. Eterično olje se je izkazalo kot primerno, saj deluje izrazito inhibitorno na rast bakterij (11, 12).

Antioksidativno delovanje so dokazali v študiji, kjer je ekstrakt cvetov dišečega klinčevca (*Syzygium aromaticum*) inhibiral oksidacijo heksanala. V veliki meri sta v ekstraktu bila prisotna evgenol in evgenilacetat, katerih učinkovitost je zelo visoka (13).



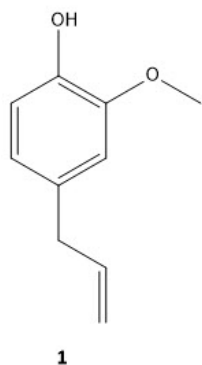
Slika 3: Klinčki oziroma dišeči klinčevce.

1.4 Evgenol

IUPAC ime: 4-metoksi-2-alilfenol

Kemijska formula: $C_{10}H_{12}O_2$

Strukturna formula:



Evgenol je dolgo znana spojina, ki se pojavlja v eteričnih oljih, pridobljenih iz klinčkov, cimeta, lovorja, bazilike in muškarnega oreška. Evgenol je bistra, brezbarvna zmerno viskozna tekočina s prijetnim vonjem in močnim pekočim okusom. Posebnost evgenola je

lokalno anestetično delovanje. Spojine, kot so anetol, evgenol in vanilin imajo močno aromo oziroma močan aromatičen okus in vonj, iz tega izhaja njihovo poimenovanje aromatske spojine (14).

1.4.1 Uporaba evgenola

Uporablja se v parfumi, natančneje v orientalskih dišavah, zaradi začimbne vonja. Pogosto ga uporabljamo v prehrabne namene. Kot vsi fenoli, ima tudi evgenol močno antiseptično delovanje, zato se uporablja v izdelkih za čiščenje ustne votline, natančneje v ustnih vodica (14, 15).

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela bo izolacija evgenola iz eteričnega olja dišečega klinčevca (*Syzygium aromaticum*) ter sinteza njegovih derivatov.

Iz cvetov dišečega klinčevca bomo izolirali eterično olje z vodno parno destilacijo. Vodna para gre skozi rastlinski material ter kondenzira. Dobimo eterično olje, ki ga ločimo od aromatične vode.

Eterično olje bomo ločili po intervalih vrelišča s frakcionirno vakuumsko destilacijo. Vzporedno bomo komercialno dostopno eterično olje nageljnovih žbic farmacevtske kakovosti prav tako ločili po intervalih vrelišča s frakcionirno vakuumsko destilacijo.

Frakcije bomo med seboj primerjali na podlagi rezultatov analize plinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo. Osredotočili se bomo na sestavo posameznih frakcij ter med sabo primerjali frakcije izoliranega eteričnega olja ter komercialno dostopnega eteričnega olja farmacevtske kakovosti.

Evgenol je v visoki meri prisoten v eteričnem olju dišečega klinčevca (*Syzygium aromaticum*) in je aktivna sestavina, zato ga bomo izolirali. Uporabili bomo klasičen pristop, ki vključuje frakcionirno destilacijo in kolonsko kromatografijo. Ker je evgenol rahlo kisl spojina, ga bomo poskusili izolirati tudi z alkalno ekstrakcijo.

Iz izoliranega evgenola bomo poskusili pripraviti sintezne derivate z različnimi reagenti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in topila

Uporabljali smo reagente in topila p. a. kakovosti naslednjih proizvajalcev: Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), Merck (Darmstadt, Nemčija), AcrosOrganics (Geel, Belgija), Fluka (Buchs, Švica) in Carlo Erba (Milano, Italija).

3.1.2 Programska oprema

Za risanje struktur in reakcijskih shem smo uporabili program ChemBioDraw Ultra proizvajalca CambridgeSoft

3.1.3 Aparature

Standardna laboratorijska steklovina, magnetno mešalo, grelna plošča Radleys Heat-On™ Block System (Shire Hill, UK), rotavapor Büchi RE 111 in vodna kopel Büchi 461 (Flawil, Švica), tehtnica Mettler PC 2000 (Columbus, Ohio, ZDA)

3.1.4 Rastlinski material

Uporabili smo nageljnovе žbice (Flores Caryophylli tot.) in eterično olje nageljnovih žbic (Oleum Caryophylli) proizvajalca Caesar Loretz GmbH (Hilden, Nemčija).

3.2 Metode

3.2.1 Izolacija eteričnega olja – destilacija z vodno paro

Rastlinsko drogo ekstrahiramo z destilacijo z vodno paro. Vodna para prodre v drogo in jo s sabo odnese s tokom, ko hlapi. V posodi, kjer zbiramo eterično olje in aromatično vodo, se ločita, saj se med sabo ne raztapljata. Z lijem ločnikom preprosto ločimo komponenti, ki se ne mešata. Eterično olje hranimo v temnih stekleničkah pri sobni temperaturi.

3.2.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Mobilna faza potuje skozi stacionarno fazo zaradi kapilarnega vleka. Uporabljamo jo za separacijo naravnih proizvodov. Služi kot priprava za razvoj metod s kolonsko kromatografijo (16).

Uporabili smo plošče DC Kieselgel 60 F254 proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija) z 0,25 mm silikagela na aluminijastem nosilcu. Kot orositveni reagent smo uporabili fosfomolibdensko kislino. Posamezne uporabljene mobilne faze so navedene pri eksperimentih.

3.2.3 Kolonska kromatografija

Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel velikosti 60, proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija), posamezne mobilne faze so navedene pri eksperimentih. Vzorec potuje z mobilno fazo, ki jo potiskamo skozi stacionarno fazo, ki ne potuje. Komponente vzorca se porazdeljujejo med mobilno in stacionarno fazo (17).

3.2.4 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H NMR spektre evgenola in njegovega derivata smo posneli s spektrometrom Bruker Avance DPX 400 pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo, kot topilo za vzorce smo uporabili CDCl_3 , za interni standard pa TMS. Posnete spektre smo analizirali s programom MestReC®.

3.2.5 Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS)

Pri plinski kromatografiji uparjen vzorec potuje z mobilno fazo (inertni plin) skozi kolono, napolnjeno s stacionarno fazo (18). Za analizo izoliranega eteričnega olja, komercialno dostopnega eteričnega olja, frakcije obeh eteričnih olj, frakcije kolonske kromatografije in alkalne ekstrakcije smo uporabili plinski kromatograf z masnim detektorjem GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska). Kolona Rxi-5Sil MS (Restek, Bellefonte, Pensilvanija, ZDA) je bila dolga 30 m, z notranjim premerom 0,25 mm ter 0,25 μm debeline nanosa, SF 5 % difenil, 95 % dimetilpolisiloksan.

3.2.6 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija je tehnika, s katero merimo razmerje mase in naboja ionov v vakuumu. Omogoča pridobitev informacij o elementni sestavi analita, strukturi anorganskih in organskih molekul, sestavi večkomponentnih vzorcev ter izotopska razmerja atomov v vzorcih (19).

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Izolacija eteričnega olja cvetov dišečega klinčevca

Postopek izolacije eteričnega olja: 1 kg droge zmeljemo, damo v 5000 mL bučo, prelijemo z vrelo vodo in destiliramo. Destilacijo smo izvajali pri temperaturi grelnega plašča 200 °C, 4 ure. Dobili smo emulzijo aromatične vode in eteričnega olja. Posebnost eteričnega olja cvetov dišečega klinčevca je v tem, da ima večjo gostoto kot voda, kar pomeni, da ko ga zbiramo v čaši z aromatično vodo, eterično olje potone. Da smo ločili fazi, smo dodali sol, zato da smo razbili emulzijo in da je aromatična voda postala težja od eteričnega olja. To pomeni, da smo na koncu v liju ločniku lovili zgornjo fazo.

Na spodnjih fotografijah je prikaz izolacije eteričnega olja ter emulzija eteričnega olja in aromatične vode v liju ločniku (slika 4).



Slika 4: Levo-destilacija z vodno paro, desno-lij ločnik.(Foto: M. Merkač)

4.1.1 Frakcionirna vakuumsko destilacija

S frakcionirno vakuumsko destilacijo smo pridobljeno eterično olje ločevali na podlagi hlapnosti. Aparaturo smo sestavili, kakor na spodnji sliki (slika 5), in pričeli s segrevanjem eteričnega olja v bučki, kjer smo predhodno ustvarili podtlak.



Slika 5: Aparatura za frakcionirno vakuumsko destilacijo. (Foto: M. Merkač)

V bučko smo nalili 50,472 g eteričnega olja. Temperatura v prostoru je bila 23 °C, tlak aparature je bil 0,3 hPa. Prvo frakcijo smo zbirali do $T = 50\text{ °C}$ in njena masa je bila 28,798 g. Drugo frakcijo smo zbirali pri $T = 60\text{--}64\text{ °C}$, njena masa pa je bila 14,744 g. V bučki je ostalo 4,378 g snovi, kar je tretja frakcija (tabela I).

Tabela I: Frakcije EO FFA.

Številka frakcije	Temperatura, tlak	Masa
1	40-50 °C, 0,3 mbar	28,798 g
2	60-64 °C, 0,3 mbar	14,744 g
3	>64 °C, 0,3 mbar	4,378 g

Destilacija komercialno dostopnega eteričnega olja je potekala pri višji temperaturi zaradi nekoliko višjega tlaka, in sicer, do 60 °C in pri tlaku 0,1 hPa pri prvi frakciji, njena masa je bila 21,065 g. Drugo frakcijo smo zbirali pri 75-85 °C, njena masa pa je bila 28,377 g. V bučki je ostalo 2,526 g snovi, kar je tretja frakcija (tabela II).

Tabela II: Frakcije EO CAELO.

Številka frakcije	Temperatura, tlak	Masa
-------------------	-------------------	------

1	55-60 °C, 0,1 mbar	21,065 g
2	75-85 °C, 0,1 mbar	28,377 g
3	>85 °C, 0,1 mbar	2,526 g

Opis izgleda frakcij: prvi dve frakciji obeh eteričnih olj sta bili brezbarvni bistri tekočini. Tretja frakcija izoliranega eteričnega olja je bila rumene barve, tretja frakcija komercialno dostopnega eteričnega olja je bila bolj rjava in motna ter malenkost manj viskozna (slika 6).



Slika 6: Videz frakcij. (Foto: M. Merkač)

Frakcije so oštevilčene sledeče: spodaj desno 1, spodaj levo 2, sredina desno 3, sredina levo 4, zgoraj desno O1, zgoraj levo O2. Številka 1, 2, O1 predstavljajo prve tri frakcije izoliranega eteričnega olja. Številka 3, 4, O2 predstavljajo prve tri frakcije komercialno dostopnega eteričnega olja.

4.1.2 TLC – analiza frakcij eteričnega olja dišečega klinčevca

Dobljene frakcije smo nato pripravili za nadaljnje proučevanje s tankoplastno kromatografijo.

Vzorke frakcij smo morali predhodno pripraviti, preden smo jih nanesti na kromatografsko ploščo. Kapljico vzorca smo dali v eppendorf epruveto (1,5 mL) ter jo razredčili z etilacetatom do prve oznake (0,5 mL).

Iskali smo primerno mobilno fazo za kolonsko kromatografijo, zato smo uporabili zmesi z različnimi prostorninskimi deleži topil. Pripravili smo zmesi topil v naslednjih razmerjih:

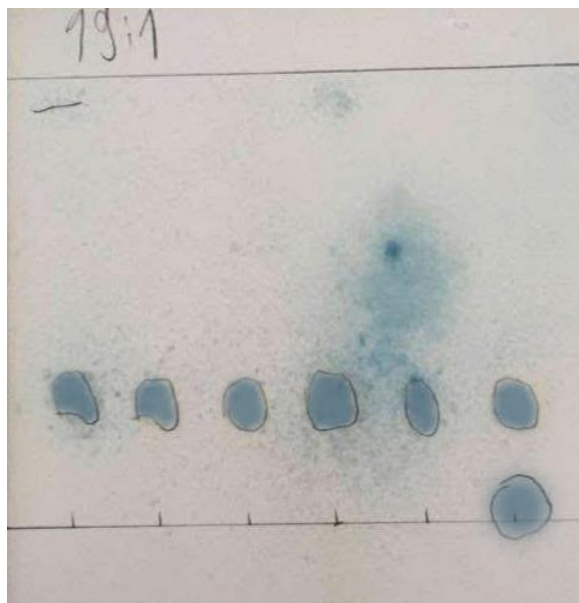
1. petroleter,
2. dietileter.
3. petroleter:etilacetat = 9:1,
4. petroleter:etilacetat = 4:1,
5. petroleter:etilacetat = 2:1,
6. petroleter:etilacetat = 1:1,
7. petroleter:etilacetat 1:2.

Na stacionarno fazo, ki je aluminijeva ploščica, na katero je adsorbiran silikagel, v približni velikosti 7×7 cm, smo približno 1 cm nad spodnjim robom v razmiku 1 cm nanesti raztopine naših vzorcev. TLC ploščico smo nato dali v kadičko, v katero smo prehodno nalili približno 20 mL mobilne faze. Ko je mobilna faza dosegla približno 1 cm pod zgornjim robom plošče, smo jo vzeli iz kadičke in označili točno do kam je segala MF. Ploščo smo posušili s toplim zrakom, pogledali pod UV-svetilko in označili lise, vidne pod UV. Na koncu smo ploščo orosili z orositvenim reagentom, ki je bil v našem primeru fosfomolibdenska kislina ter posušili s pištolo na vroči zrak, da so se pokazale lise.

Nobena od prej napisanih zmesi mobilnih faz ni bila optimalna, saj so bile lise previsoko ali prenizko na ploščici. Nadaljevali smo z iskanjem primerne MF. Uporabili smo še naslednje zmesi:

1. dietileter:petroleter = 3:1,
2. dietileter:petroleter = 2:1,
3. dietileter:petroleter = 1:1,
4. dietileter:petroleter = 1:2,
5. dietileter:petroleter = 1:3,
6. petroleter:etilacetat = 19:1.

Najbolj primerna zmes je bila zmes petroleter:etilacetat v razmerju 19:1 (slika 7).



Slika 7: TLC primerne mobilne faze v razmerju 19:1. (Foto: M. Merkač)

4.1.3 Kolonska kromatografija

Kolono smo najprej sprali z mobilno fazo, ki je bila najprimernejša v poskusih s tankoplastno kromatografijo, in sicer petroleter:etilacetat v razmerju 19:1. Na dno kolone smo previdno nasuli pesek, približno 1 mm v višino. V čaši smo nato pripravili suspenzijo silikagela v mobilni fazi in z njo napolnili kolono. Ko smo kolono napolnili do primerne višine in se je silikagel posedel, smo na vrh previdno dodali približno 1 mm plasti peska. Na dnu kolone smo odprli petelinček in skozi kolono izpustili mobilno fazo, do višine peska. Natehtali smo 3,277 g prve frakcije izoliranega eteričnega olja, ga raztopili v minimalni količini mobilne faze ter ga previdno, počasi, po kapljicah nanесли na vrh kolone ter eluirali z mobilno fazo (slika 8). V koloni smo ustvarili podtlak, da smo imeli zadosten pretok mobilne faze skozi kolono v zbirne erlenmajerice in kasneje epruvete. Zbrali smo 92 frakcij v epruvetah, prvih 51 frakcij smo zavrgli, saj na TLC ploščah ni bilo videti spojin. Združili smo epruvete od številke 52 do 92 in z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom (rotavaporjem), pri 45 °C odparili topilo.



Slika 8: Kolona. (Foto: M. Merkač)

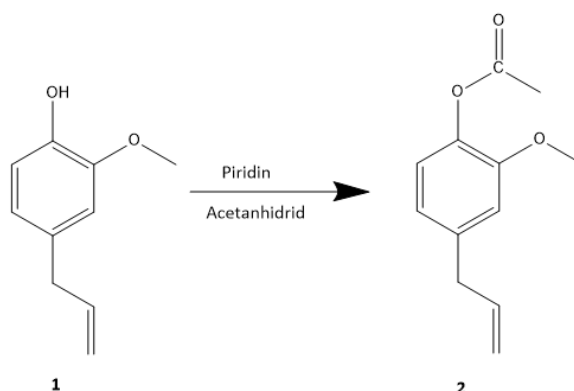
Kasneje smo z NMR in GC-MS preverili ustreznost izoliranega evgenola.

4.1.4 Alkalna ekstrakcija

Natehtali smo 5,180 g druge frakcije izoliranega eteričnega olja in dodali 50 mL 1M NaOH. Evgenol reagira z NaOH in nastane natrijeva sol. Dodali smo 50 mL dietiletra ter zmes prenesli v lij ločnik. Lovili smo spodnjo-vodno fazo, saj je tam natrijeva sol evgenola. K vodni fazi smo dodali koncentrirano HCl do pH = 2, da je nastal neioniziran evgenol, ki je topen v organskem topilu. Ekstrahirali smo z etilacetatom in lovili organsko fazo. Organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaCl, da smo odstranili v organski fazi raztopljeno vodo in jo sušili še z brezvodnim natrijevim sulfatom za fino sušenje. Nato smo z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom odparili topilo. Kasneje smo z NMR in GC-MS preverili ustreznost izoliranega evgenola.

4.2 Sinteza derivatov evgenola

4.2.1 Reakcija acetiliranja



0,50 g evgenola smo dodali 10 mL piridina, 1 mL acetanhidrida in po eni uri 2 kristala 4-dimetilaminopiridina ter pri povišani temperaturi (65 °C) mešali čez noč. Naslednji dan smo odparili topilo z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom. Dobljeno snov smo ekstrahirali z zmesjo citronske kisline in etilacetata. Lovili smo organsko fazo, ki smo ji kasneje dodali natrijev sulfat (sušilno sredstvo) ter odparili topilo z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, uporabili smo mobilno fazo petroleter:etilacetat v razmerju 9:1. Kasneje smo z NMR in GC-MS preverili ustreznost evgenilacetata.

4.3 GC-MS

Z GC-MS smo analizirali izolirano eterično olje, komercialno dostopno eterično olje, frakcije izoliranega eteričnega olja, frakcije komercialno dostopnega eteričnega olja, produkt kolonske kromatografije ter produkt alkalne ekstrakcije.

Razmere analize:

- nosilni plin: helij
- pretok plina: 1 mL/min
- celoten čas analize: 76,67 min
- način injiciranja: »split« 1:100
- temperatura injektorja: 250 °C
- temperatura vmesnika: 250 °C
- temperaturni program: 50 °C (5 min), 50→250 °C (3 °C/min), 250 °C (5 min)

Kolona:

- $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$, $df = 0,25\text{ }\mu\text{m}$
- 5 % difenil, 95 % dimetilpolisiloksan

MS:

- temperatura ionskega izvora: $200\text{ }^{\circ}\text{C}$
- energija ionizacije: -70 eV
- napetost na detektorju: 1 kV
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz
- območje merjenja relativne molekulske mase (m/z): 40-500

UMERITVENA PREMICA:

15,0 mg evgenola smo raztopili v 5 ml heksana. Dobili smo koncentracijo 3 mg/ml , kar ustreza 3000 ppm. To smo redčili na 1500 ppm, 750 ppm, 300 ppm, 150 ppm in 75 ppm.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar k izolaciji eteričnega olja

Sprva smo vso drogo destilirali v eni 5000 mL buči, ampak smo po približno eni uri ugotovili, da je ta premajhna, ker smo destilirali zelo malo količino eteričnega olja (nekaj kapljic). Drogo in topilo smo ločili v dve buči po 5000 mL, po tem je destilacija potekala hitreje.

Na analiznem certifikatu je bilo navedeno, da lahko iz 1 kg droge, izoliramo 191 mL eteričnega olja. Dejanska količina izoliranega eteričnega olja je bila 54 mL. Predvidevamo, da so te informacije navedene napačno, ali pa je prišlo do laboratorijske napake.

5.2 Komentar h GC-MS

S sklopljeno tehniko plinske kromatografije in masnega detektorja smo analizirali izolirano eterično olje ter komercialno dostopno eterično olje.

V tabeli III in IV so predstavljeni rezultati GC-MS z imeni spojin, retencijskimi indeksi, ki smo jih izmerili, retencijskimi indeksi, ki so navedeni v literaturi, ter odstotki relativne površine. Dodan je tudi kromatogram izoliranega eteričnega olja.

Tabela III: EO FFA.

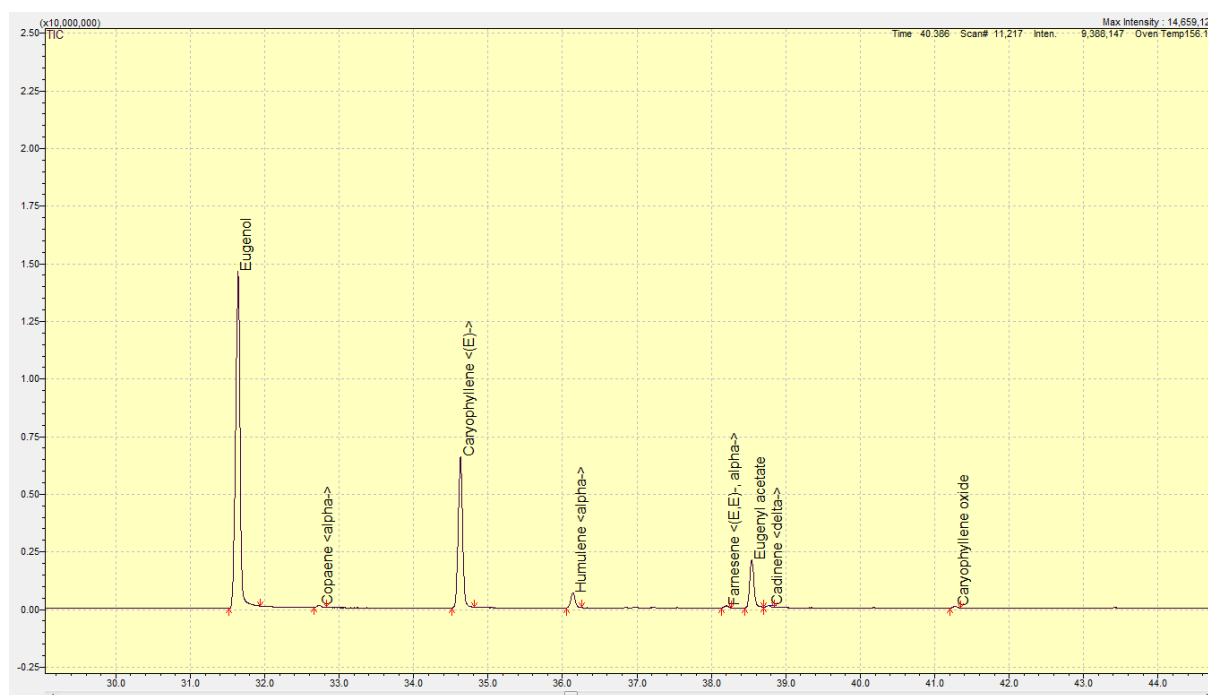
SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	60,8 (76,0 abs.)
α -kopaen	1374	1375	0,42
β -kariofilen	1418	1424	26,7
α -humulen	1453	1454	2,68
farnezen	1503	1504	0,33
evgenilacetat	1511	1521	8,46
δ -kadinen	1517	1518	0,35
kariofilenoksid	1579	1587	0,24

Tabela IV: EO CAELO.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
---------	----------------------	---------------------------	-----------------

evgenol	1350	1357	78,2 (94,1 abs.)
α -kopaen	1374	1375	0,09
β -kariofilen	1418	1424	12,6
α -humulen	1453	1454	2,42
farnezen	1503	1504	0,08
evgenilacetat	1511	1521	6,20
δ -kadinen	1517	1518	0,23
kariofilenoksid	1579	1587	0,12

Kromatogram EO FFA:



5.2.1 Primerjava eteričnih olj

Potrdili smo, da ima eterično olje dišečega klinčevca veliko vsebnost evgenola. Komercialno dostopno EO ga vsebuje več, kakor izolirano EO. Na certifikatu eteričnega olja je navedeno, da vsebuje 82,3 % evgenola, vendar iz razpredelnice razberemo, da ga vsebuje 78,2 % glede na relativne površine vrhov oziroma 94,1 % po kvantifikaciji z uporabo umeritvene premice. Farmakopeja predpisuje, da mora eterično olje dišečega klinčevca vsebovati 5,0 do 14,0 % β -kariofilena, 75,0 do 88,0 % evgenola in 4,0 do 15,0 % evgenilacetata. Komercialno dostopno eterično olje ustreza tem predpisom le, če upoštevamo delež evgenola, preračunan iz relativnih

površin vrhov, medtem ko izolirano eterično olje ustreza, če upoštevamo kvantifikacijo z umeritveno premico. Možno je, da smo naredili laboratorijsko napako, ali pa navedeni podatki v certifikatu za komercialno eterično olje niso pravilni. Oba vzorca vsebujeta še druge sestavine, le da komercialno dostopno v veliko manjši količini.

Opazili pa smo zanimivost, da komercialno dostopno eterično olje vsebuje predpisane snovi, ostalih snovi pa vsebuje zelo malo v primerjavi z izoliranim. To nakazuje na možnost, da je to eterično olje (delno) sintezno pridobljeno.

5.3 Komentar k frakcionirni vakuumski destilaciji

Frakcionirno vakuumsko destilacijo uporabljamo zato, da posamezne komponente snovi ločimo glede na različne temperature vrelišč. Pomagamo si s tem, da ustvarimo podtlak, saj so zaradi tega vrelišča spojin pri nižji temperaturi kakor sicer. Posamezne frakcije smo analizirali s sklopljeno tehniko plinske kromatografije in masnega detektorja.

V sledečih tabelah (tabela V, VI, VII, VIII, IX, X) so predstavljeni rezultati GC-MS z imeni spojin, retencijskimi indeksi, ki smo jih izmerili, retencijskimi indeksi, ki so navedeni v literaturi, ter odstotki relativne površine.

Tabela V: Frakcija 1 EO FFA.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	65,1
α -kopaen	1374	1375	0,32
β -kariofilen	1418	1424	29,1
α -humulen	1453	1454	3,22
farnezen	1503	1504	0,38
evgenilacetat	1511	1521	1,41
δ -kadinen	1517	1518	0,39
kariofilenoksid	1579	1587	0,07

Tabela VI: Frakcija 2 EO FFA.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
---------	-------------------------	------------------------------	-----------------

evgenol	1350	1357	88,7
α -kopaen	1374	1375	-
β -kariofilen	1418	1424	5,00
α -humulen	1453	1454	0,94
farnezen	1503	1504	0,34
evgenilacetat	1511	1521	4,46
δ -kadinen	1517	1518	0,26
kariofilenoksid	1579	1587	0,31

Tabela VII: Frakcija 3 EO FFA.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	30,2
α -kopaen	1374	1375	-
β -kariofilen	1418	1424	-
α -humulen	1453	1454	-
farnezen	1503	1504	-
evgenilacetat	1511	1521	68,8
δ -kadinen	1517	1518	-
kariofilenoksid	1579	1587	0,98

Tabela VIII: Frakcija 1 EO CAELO.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	74,9
α -kopaen	1374	1375	0,15
β -kariofilen	1418	1424	20,0
α -humulen	1453	1454	3,31
farnezen	1503	1504	0,07
evgenilacetat	1511	1521	1,28

δ -kadinen	1517	1518	0,21
kariofilenoksid	1579	1587	0,05

Tabela IX: Frakcija 2 EO CAELO.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	89,8
α -kopaen	1374	1375	-
β -kariofilen	1418	1424	4,35
α -humulen	1453	1454	1,07
farnezen	1503	1504	-
evgenilacetat	1511	1521	4,63
δ -kadinen	1517	1518	0,09
kariofilenoksid	1579	1587	0,18

Tabela X: Frakcija 3 EO CAELO.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	38,9
α -kopaen	1374	1375	-
β -kariofilen	1418	1424	-
α -humulen	1453	1454	-
farnezen	1503	1504	-
evgenilacetat	1511	1521	60,6
δ -kadinen	1517	1518	-
kariofilenoksid	1579	1587	0,48

Višja, kot je frakcija, manj komponent vsebuje in te so težje hlapne. Sklepamo tudi, da evgenol, evgenilacetat ter kariofilenoksid sodijo med težko hlapne komponente, saj so prisotne v vseh frakcijah eteričnih olj.

Frakciji 2 EO FFA in EO CAELO vsebujeta več kot 88,7 % evgenola, zato sklepamo, da ima vrelišče pri 64 °C, 0,3 hPa oziroma pri 85 °C, 0,1 hPa.

Evgenilacetat vsebujeta frakciji 3 EO FFA in EO CAELO več kot 60,6 %. Sklepamo, da je vrelišče evgenilacetata nad 64 °C pri 0,3 hPa oziroma nad 85 °C pri 0,1 hPa.

5.4 Komentar h kolonski kromatografiji

Kolonska kromatografija se uporablja za čiščenje snovi. Z GC-MS smo preverili, kako dobro smo prvo frakcijo izoliranega EO očistili s kolono (tabela XI).

Tabela XI: Kolona frakcija 1 EO FFA.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	98,0
α -kopaen	1374	1375	-
β -kariofilen	1418	1424	0,85
α -humulen	1453	1454	0,10
farnezen	1503	1504	-
evgenilacetat	1511	1521	1,03
δ -kadinen	1517	1518	-
kariofilenoksid	1579	1587	-

Čiščenje prve frakcije izoliranega EO s kolono je bilo uspešno, saj le-ta vsebuje kar 98,0 % evgenola.

5.5 Komentar k alkalni ekstrakciji

Z alkalno ekstrakcijo smo iz druge frakcije EO izolirali evgenol. Organsko fazo smo ekstrahirali z NaOH, da smo prenesli evgenol v vodno fazo, saj je nastala natrijeva sol. Kasneje smo počasi dodali HCl, da je znižal pH. Reekstrahirali smo z etilacetatom, da se je evgenol vrnil v organsko fazo (14). Z GC-MS smo preverili, ali je ekstrakcija evgenola uspela (tabela XII). S to metodo smo izolirali 100-odstotno čist evgenol.

Tabela XII: Alkalna ekstrakcija frakcija 2 EO FFA.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	100
α -kopaen	1374	1375	-
β -kariofilen	1418	1424	-
α -humulen	1453	1454	-
farnezen	1503	1504	-
evgenilacetat	1511	1521	-
δ -kadinen	1517	1518	-
kariofilenoksid	1579	1587	-

5.6 Komentar k reakciji acetiliranja

Z GC-MS smo preverili produkt reakcije acetiliranja. Ugotovili smo, da smo sintetizirali 100-odstotno čist evgenilacetat (tabela XIII).

Tabela XIII: Reakcija acetiliranja.

SPOJINA	RET. INDEKS IZMERJEN	RET. INDEKS IZ PODATKOVNE	% REL. POVRŠINE
evgenol	1350	1357	-
α -kopaen	1374	1375	-
β -kariofilen	1418	1424	-
α -humulen	1453	1454	-
farnezen	1503	1504	-
evgenilacetat	1511	1521	100
δ -kadinen	1517	1518	-
kariofilenoksid	1579	1587	-

5.7 Komentar k NMR

Z NMR smo potrdili identiteto evgenola in evgenilacetata.

Evgenol (priloga IV, V):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.25 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz, Ar-CH₂), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.90-5.01 (m, 2H, CH₂), 5.94 (m, 1H, CH), 6.56 (m, 1H, Ar-H), 6.69 (m, 1H, Ar-H), 6.73 (m, 1H, Ar-H), 8.73 (s, 1H, OH) ppm.

Evgenilacetat (priloga VI):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.33 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz, Ar-CH₂), 3.74 (s, 3H, CH₃), 5.12 (m, 2H, CH₂), 5.98 (m, 1H, CH), 6.80 (m, 2H, Ar-H), 6.96 (m, 1H, Ar-H) ppm.

6 SKLEP

Uspešno smo izolirali eterično olje cvetov dišečega klinčevca ter kasneje evgenola. S frakcioniranjem olja in kolonsko kromatografijo smo izolirali 98-odstotno čist evgenol, z metodo alkalne ekstrakcije pa 100-odstotno čist evgenol. Sinteza derivata evgenola, natančneje evgenilacetata, je prav tako bila uspešna. Čistota sintetiziranega produkta je bila 100-odstotna.

Ugotovili smo, da izolirano eterično olje ustreza predpisom iz Farmakopeje glede vsebnosti evgenola, izračunane iz umeritvene premice. Komercialno dostopno eterično olje ustreza Farmakopejskim predpisom zgolj, če upoštevamo delež evgenola, izračunan iz relativnih površin vrhov.

Med eksperimentalnim delom diplomske naloge smo se natančneje spoznali s potekom vodno parne destilacije, frakcionirne vakuumске destilacije, tankoplastne kromatografije, kolonske kromatografije, potekom alkalne ekstrakcije, izvedbo sinteze evgenola, analizo z GC-MS ter nasploh z delom v laboratoriju.

7 LITERATURA

1. Doljak B, Štrukelj B, Mlinarič A: Zdravila naravnega izvora in sodobna fitoterapija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, 2003: 163, 167, 168
2. <http://www.jazmp.si/zdravila-za-uporabov-humani-medicini/dovoljenje-za-promet-z-zdravilom/zdravila-rastlinskega-izvora/> Datum dostopa: 16.8.2016
3. Cook CM, Lanaras T: Essential Oils: Isolation, Production and Uses. Reference Module in Food Science, Encyclopedia of Food and Health 2015; null: 552-557
4. Kreft S, Kočevlar Glavač N, Stojilkovski K, Mlinarič A, Injac R, Novak A, Doljak B, Štrukelj B, Slanc Može P, Umek A, Lunder M, Kristl J, Janeš D, Berlec A, Sabotič J, Glavač I: :Sodobna fitoterapija, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2013: 22
5. Tisserand R, Young R: Essential oil safety, Elsevier, British Library Cataloguing in Publication Data, 2014: 5-7, 559, 254-256
6. Wenqiang G, Li S, Yan R, Tang S, Quan C: Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food Chemistry 2007; 101: 1558-1564
7. Yazdani F, Mafi M, Farhadi F, Tabar-Heidar K, Aghapoor K, Mohsenzadeh F, Darabi HR: Supercritical CO₂ Extraction of Essential Oil from Clove Bud: Effect of Operation Conditions on the Selective Isolation of Eugenol and Eugenyl Acetate. Zeitschrift für Naturforschung B 2005; 60: 1197 – 1201
8. Huie CW: A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2002; 373: 23-30
9. Cortés-Rojas DF, Fernandes de Souza CR, Oliveira WP: Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2014; 83: 90-96
10. <http://www.pomurske-lekarne.si/tocka-zdravja/klincevec-diseci-syzygium-aromaticum> Datum dostopa: 16.8.2016
11. Dorman HJD, Deans SG: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 2000; 172: 308-316
12. Ranasinghe L, Jayawardena B, Abeywickrama K: Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry

- against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters in Applied Microbiology 2002; 35: 208-211
13. Lee K-G, Shibamoto T: Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. Food Chemistry 2001; 74: 443-448
 14. Berger S, Sicker D: Classics in Spectroscopy, Deutsche Nationalbibliothek, Weinheim, 2009: 143-152
 15. Aparecido ND, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN: Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. Brazilian Journal of Pharmacognosy 2009; 19: 212-217
 16. Pothier J, Galand N, El Ouali M, Viel C: Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. Farmaco 2001; 56: 505-511
 17. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/column.html> Datum dostopa: 9.9.2016
 18. Ilaš J, Žakelj S: Instrumentalna analiza v kozmetiki, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, 2013: 53-61
 19. Glish GL, Vachet RW: The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. Nature Reviews Drug Discovery 2003: 140-150

7.1 VIRI SLIKOVNEGA GRADIVA

Fotografije so last diplomanta, izjema so fotografije (datum dostopa do vseh navedenih spletnih strani: 16.8.2016):

20. <http://www.salvix.si/wp-content/uploads/2013/10/medicinal-herbs-fitoterapija.jpg> (slika 1)
21. <http://www.bodieko.si/wp-content/uploads/2013/09/etericno-olje-1024x779.jpg> (slika 2)
22. http://2.bp.blogspot.com/-7sn9l6AvER0/Vn6SoTlF08I/AAAAAAAAABDg/_1AXXb9hflM/s1600/2015-12-26%2B13.36.02.jpg (slika 3)

8 PRILOGE

Priloga I: Certifikat nageljnovih žbic

Quality Control
CAESAR LORETZ GmbH
Herderstr. 31
D-40721 Hilden

Certificate of analysis



Article	162	Flores Caryophylli tot.
Synonym		Gewürznelken
Synonym		Clove
Batch	153255	
Specification	PH.EUR. 8.0	
Expiry date	09.2017	
Test	Specification	Result
Characters	In accordance	Complies
Identification	In accordance	Complies
-A	In accordance	Complies
-B	In accordance	Complies
-Thin-layer chromatography	In accordance	Complies
Tests	In accordance	Complies
-Peduncles, petioles and fruits	Max 6 %	Max 6 %
-Deteriorated cloves	Max 2 %	Max 2 %
-Other foreign matter	Max 0,5 %	Max 0,5 %
-Total ash	Max 7,0 %	4,8 %
Assay (essential oil) (m/kg)	Min 150	191
Complies specification	*****	Yes
Release date	13.10.2015	Head of Quality Control i.A. M. Rauch

This document has been generated automatically and is valid without a signature.

Priloga II: Certifikat eteričnega olja nageljnovih žbic CAELO

Quality Control
CAESAR LORETZ GmbH
Herderstr. 31
D-40721 Hilden

Certificate of analysis



Article	g432	Oleum Caryophylli
Synonym		Nelkenöl
Synonym		Clove oil
Batch	154021	
Specification	PH.EUR. 8.0	
Expiry date	10.2018	

Test	Specification	Result
Characters	In accordance	Complies
-Appearance	In accordance	Complies
-Solubility	In accordance	Complies
Identification	In accordance	Complies
-Thin-layer chromatography	In accordance	Complies
-Gas chromatography	In accordance	Not carried out
Tests	In accordance	Complies
-Relative density	1,030 - 1,063	1,0492
-Refractive index	1,528 - 1,537	1,5348
-Optical rotation	-2 - 0°	-0,6°
-Fatty oils and resinified ess. oils	In accordance	Complies
-Solubility in alcohol	In accordance	Complies
Chromatographic profile	In accordance	Complies
-beta-Caryophyllene	5,0 - 14,0 %	10,1 %
-Eugenol	75,0 - 88,0 %	82,3 %
-Acetyleneugenol	4,0 - 15,0 %	5,0 %
Complies specification	*****	Yes

Quality Control
CAESAR LORETZ GmbH
Herderstr. 31
40721 Hilden

Certificate of analysis

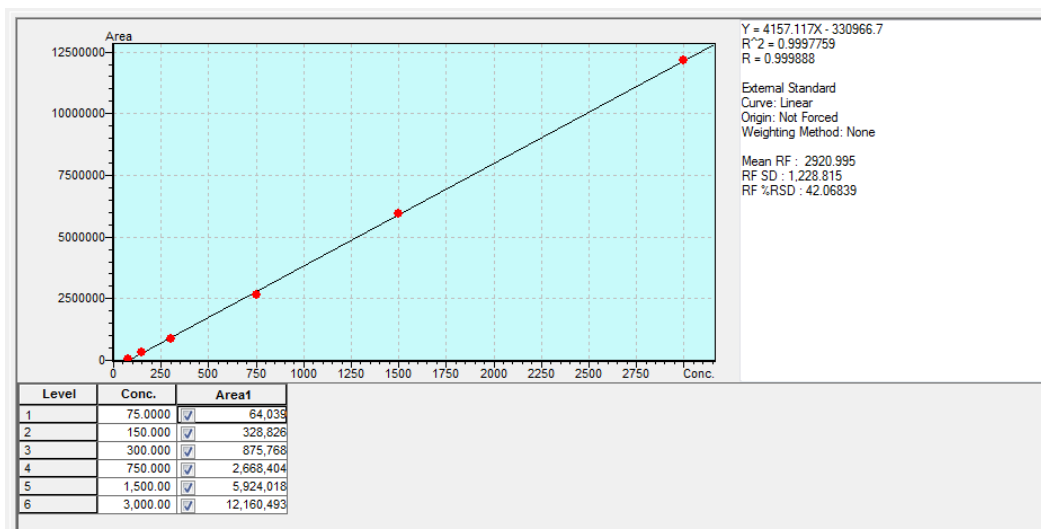


Article	g432	Oleum Caryophylli
Synonym		Nelkenöl
Synonym		Clove oil
Batch	154021	
Specification	PH.EUR. 8.0	
Expiry date	10.2018	

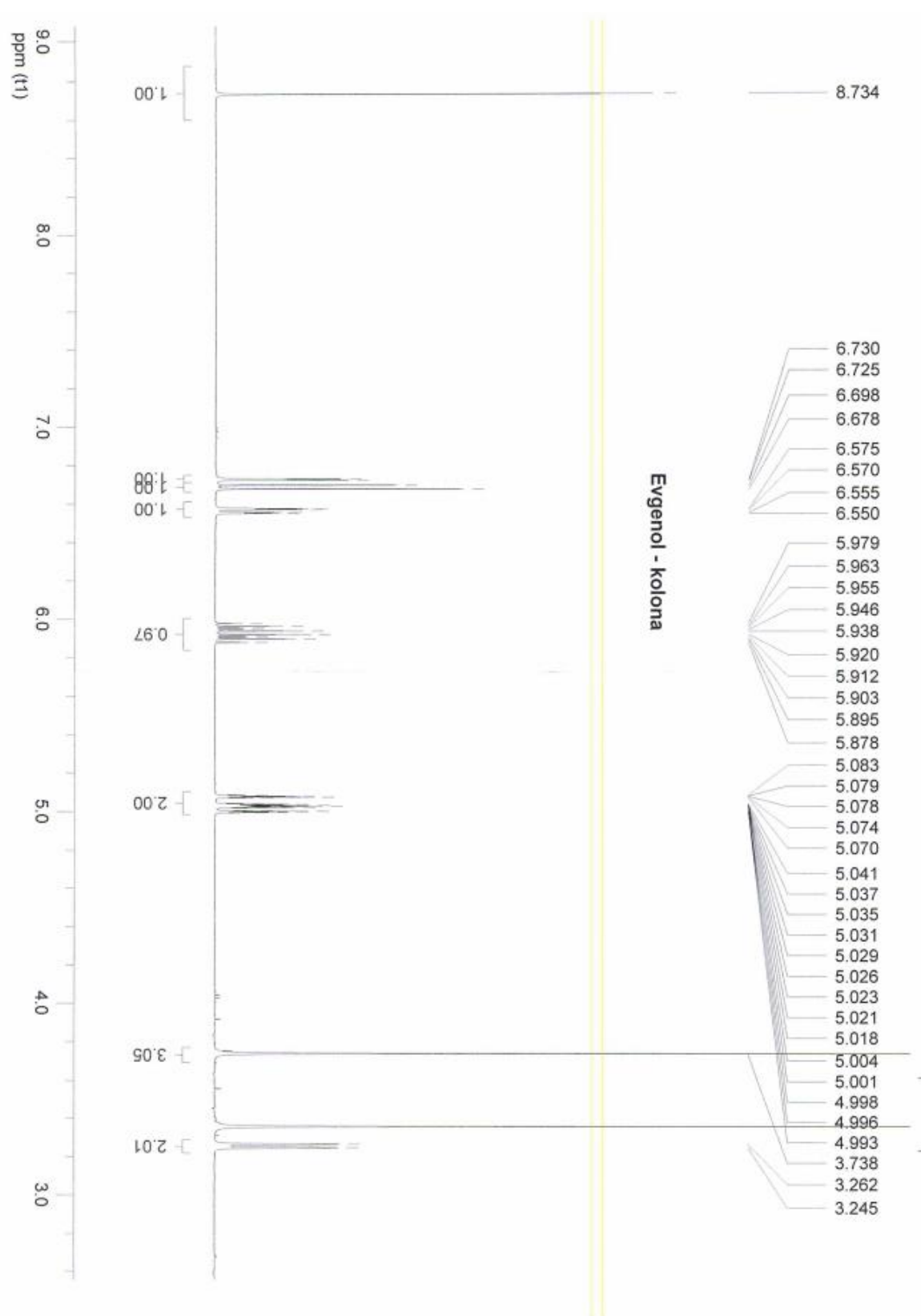
Test		Specification	Result
Release date	20.11.2015	Head of Quality Control	Fr. Dr.Haßel

This document has been generated automatically and is valid without a signature.

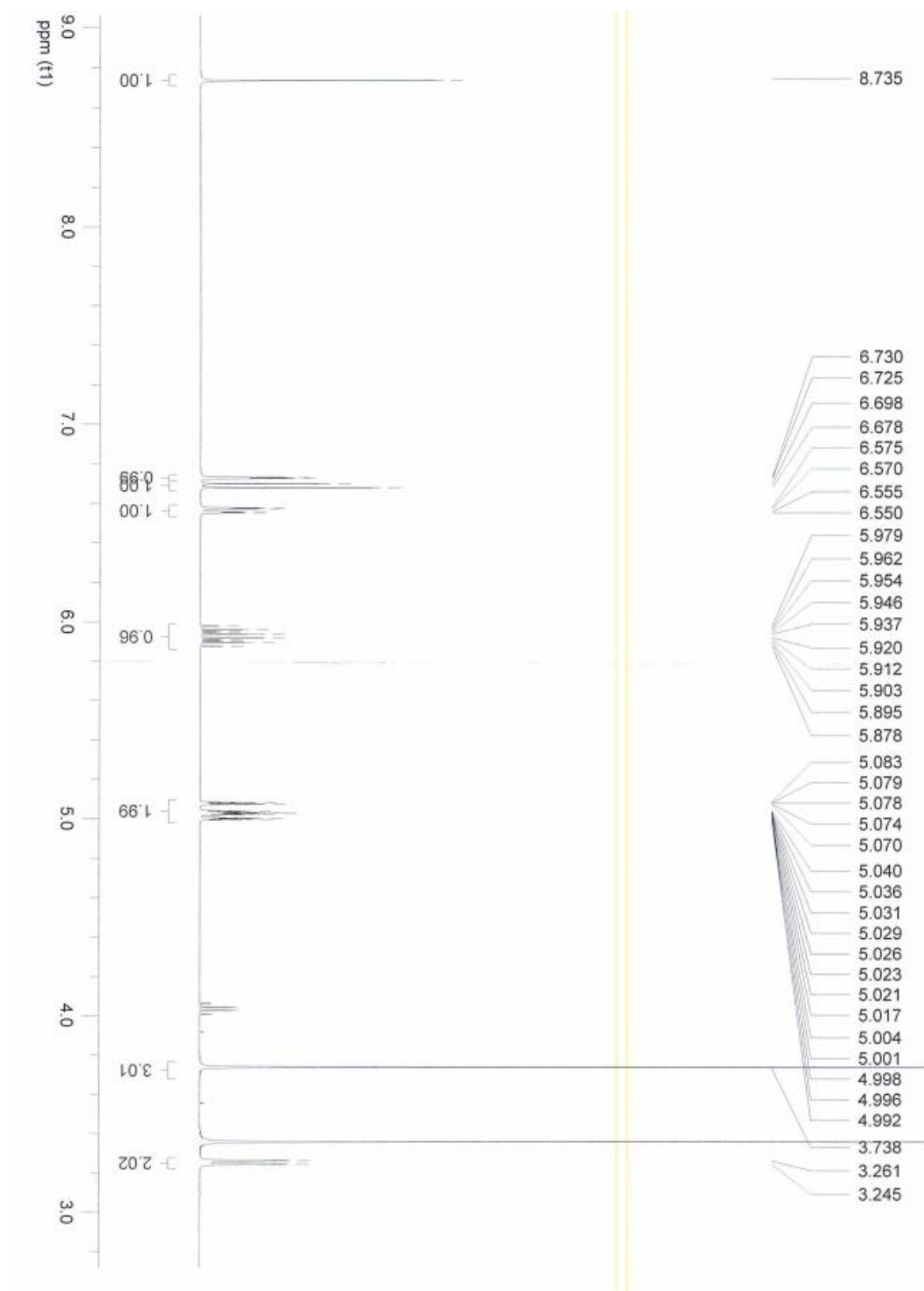
Priloga III: Umeritvena premica



Priloga IV: NMR spekter evgenola pridobljena s kolonsko kromatografijo.



Priloga V: NMR spekter evgenola pridobljen z alkalno ekstrakcijo.



Priloga VI: NMR spekter evgenilacetata.

